

## NCI-H1299-RFP-solut | 300272

## Yleisiä tietoja

## Description

NCI-H1299 RFP -solut, jotka on muunnettu siten, että ne sisältävät DAPK1-geenin reportterin, eivät ole hyödyllisiä ainoastaan tietyn geenin aktivoitumisen tutkimisessa, vaan ne antavat myös laajemman käsityksen siitä, miten solut reagoivat epigeneettisiin lääkkeisiin maailmanlaajuisesti. Käyttämällä Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) -tekniikkaa tutkijat ovat pystyneet selvittämään yksityiskohtaisesti muutokset siinä, missä transkriptio alkaa koko genomissa, kun he saavat hoitoja DNMTi:llä (DAC), HDACi:lla (SAHA tai SB939) tai niiden yhdistelmillä. Menetelmä paljastaa paitsi DAPK1-geenin odotetun uudelleenaktivoitumisen myös uusien transkription aloituskohtien, joita kutsutaan hoidon aiheuttamiksi ei-annotoiduiksi TSS-kohdiksi (TINAT), syntymisen erityisesti lääkehoidon yhteydessä. Nämä uudet aloituskohdat sijaitsevat tyypillisesti genomien alueilla, jotka eivät yleensä tuota proteiineja, ja ne johtavat sellaisten uusien RNA-molekyylien syntyyn, jotka voisivat mahdollisesti koodata proteiineja.

Tarkempi analyysi osoittaa, että nämä uudet RNA-molekyylit voivat joskus yhdistyä olemassa oleviin molekyyliin muodostaen niin sanottuja TINAT-exon-fuusio-transkriptejä. Riippuen siitä, miten nämä transkriptit liitetään, ne voivat kääntyä uusiksi epätyypilliseksi proteiineiksi. Tämä prosessi on vahvistettu laboratoriotekniikoilla, jotka osoittavat, että nämä transkriptit voivat todellakin johtaa uusien proteiini-tyyppien tuotantoon. Nämä proteiinit voivat olla epänormaalissa vuorovaikutuksessa solun sisällä tai immuunijärjestelmä voi tunnistaa ne vieraisiksi, mikä voi tarjota uusia kohteita syöpähoitoon.

Näiden TINATien aktivoitumiseen liittyy monimutkaisia muutoksia sekä DNA-metylaatioissa että histonimodifikaatioissa, mikä osoittaa näiden epigeneettisten tekijöiden monimutkaisen vuorovaikutuksen lääkehoidon yhteydessä. Erityisesti DAC:n ja SB939:n yhdistelmäkäytöllä on suurempi vaikutus, sillä se lisää näiden uusien transkriptien ilmentymistä enemmän kuin kumpaakin lääkettä yksinään käytettäessä. Näiden vuorovaikutusten ja niiden tulosten ymmärtäminen auttaa selvittämään, miten epigeneettiset hoidot muuttavat solujen käyttäytymistä, ja avaa mahdollisuuksia uusille syöpähoitoille, jotka hyödyntävät näitä monimutkaisia molekyyli- ja signaalimuutoksia.

**Organism** Ihminen

**Tissue** Keuhkot

**Disease** Suurisoluinen karsinoma

## Ominaisuudet

**Morphology** Epiteelin kaltainen

**Growth properties** Tarttuva

## Säätelytiedot

## NCI-H1299-RFP-solut | 300272

**Citation** NCI-H1299-EGFP, G418-resistenssillä ja vaimennetulla raportointigeenillä (DKFZ # P-1045) (Cytion-tuotenumero 300272)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Biomolekyyli tiedot****Käsittely**

**Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilia glutamiinia, w: 2,0 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Cytionin artikkelinumero 820700a)

**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

**Fluid renewal** 2-3 kertaa viikossa

**Freeze medium** Kryosäilytysmediaan käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

## NCI-H1299-RFP-solut | 300272

### Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

### Incubation Atmosphere

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , kostutettu ilmakehä.

### Flask Coating

Optimaalisen kiinnittymisen ja elinkelpoisuuden saavuttamiseksi sulatuksen jälkeen suosittelemme **kollageenipinnoitettujen pullojen tai levyjen** käyttöä.

### Freezing Procedure

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

## NCI-H1299-RFP-solut | 300272

### Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäissä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

### Storage Conditions

Pitkäaikaisäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

## Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

### Sterility

Mykoplasmaakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.